

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：99999

研究種目：奨励研究

研究期間：2022～2022

課題番号：22H04280

研究課題名 固相誘導体化 - 同位体希釈質量分析法によるヒト血液中グリホサートの新規定量法の確立

研究代表者

鈴木 雄亮 (SUZUKI, YUSUKE)

千葉県警察本部 科学捜査研究所・科学捜査研究所 専門研究員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000円

研究成果の概要：中毒事案が散見される含リンアミノ酸系除草剤グリホサート（GLYP）についてヒト血液中GLYPの新規定量分析法を開発した。血液にGLYP・安定同位体置換GLYP（ ）を添加し、簡便・迅速な固相誘導体化法（ ）による前処理を行い、生成物を質量分析法（ ）で検出したところ、非常に精度の高い定量が可能となった。

安定同位体置換GLYP：GLYPと極めて類似した性質を持ち、様々な誤差を補正する役割を担う物質 固相誘導体化法：固相（吸着剤）に目的物質を保持させた状態で誘導体化反応（目的物質に化学反応を施し、その性質を変化させること）を行う方法 質量分析法：化学物質をイオン状態とした後、その質量を調べる方法

研究成果の学術的意義や社会的意義

含リンアミノ酸系除草剤グリホサートは、ホームセンター等で購入が可能で広く流通していることから、中毒事案（混入事件・誤飲事故等）が散見される。このような場合、被摂取者の血液を分析し、中毒原因物質がグリホサートであることを特定するための「定性」分析に加えて、その量を把握するための「定量」分析が必要となる。従来の方は、操作が非常に煩雑で長時間を要し、定量の精度も十分ではないという問題があった。本研究では「固相誘導体化」と「同位体希釈質量分析法」を組み合わせることで、簡便・迅速・高精度な定量が達成された。本法は、犯罪捜査や救急医療等で必要となる薬毒物分析の迅速化・高度化の一助になるものと期待される。

研究分野：分析化学

キーワード：含リンアミノ酸系除草剤 グリホサート 固相誘導体化 同位体希釈質量分析法 安定同位体置換グリホサート

1. 研究の目的

薬毒物の使用が疑われる中毒事案（飲食物に混入する傷害事件・誤飲事故等）が発生した場合、被摂取者の血液について薬毒物検査が行われるが、その際、中毒原因物質が何であるかを特定するための「定性分析」だけではなく、中毒レベルを把握するための「定量分析」も求められることが多い。

中毒事案では、医薬品（睡眠薬・抗うつ薬等）、乱用薬物（麻薬・覚醒剤等）、農薬（殺虫剤・除草剤等）、重金属類（ヒ素・タリウム等）、アルカロイド（ニコチン・カフェイン等）、有機溶剤（アルコール・シンナー等）等、幅広い化学物質が分析対象となり得る。この中で、含リンアミノ酸系除草剤に分類されるグリホサート（GLYP）は、一般に広く流通しており、ホームセンターやドラッグストア等で容易に購入可能であるため、中毒事案が数多く発生しており、GLYP は薬毒物検査において極めて重要な分析対象物質と位置付けられる。

薬毒物検査においては、定性分析では「簡便さ」や「迅速さ」が、定量分析では「高精度であること」が求められるが、GLYP はリン酸基およびアミノ酸構造を有するため非常に極性が高く、一般的な疎水性の薬毒物と比較すると、前処理（固相抽出（SPE）濃縮誘導体化反応濃縮）が煩雑で長時間（2時間）を要し、簡便・迅速であるとは言い難い。また、前処理の工程が多く、定量分析では誤差が大きくなりやすいという問題がある。

研究代表者はこれまでの研究で、メタボロミクスの分野等において生体試料中のアミノ酸を簡便・迅速に分析する方法として注目されている「固相誘導体化」という技術が血液中のGLYPの分析に適用可能であることを明らかにしてきた。本研究ではこの「固相誘導体化」と、高精度な定量法として知られる「同位体希釈質量分析法」を組み合わせた血液中GLYPの迅速・簡便かつ精度の高い新規定量法を確立することを目的とした。

2. 研究成果

- (1) GLYP を添加したヒト血液（全血）を作製した。
- (2) 上記(1)のヒト血液に、内部標準物質として安定同位体置換 GLYP（GLYP-2-¹³C、¹⁵N）水溶液を添加し、これを試料とした。
- (3) アニオン性である GLYP を保持するための固相として 4 級アンモニウム基を有する強塩基性アニオン交換固相を選択し、これが充填された固相抽出（SPE）カートリッジ（固相充填量 500 mg、リザーバー容量 3 mL）を用いた。固相上で保持された GLYP を誘導体化するための試薬としてアミノ基の保護試薬であるクロロギ酸 9-フルオレニルメチル（FMOC-Cl）を、誘導体化時の pH 調整剤として四ホウ酸ナトリウム 10 水和物を用いた。
- (4) 試料を 5 倍量の超純水で希釈して攪拌後、遠心分離（12,000 rpm、5 分間）により得られた上清をアセトニトリルおよび超純水でコンディショニングした SPE カートリッジに通液した。つぎに、超純水およびアセトニトリルでカートリッジを順次洗浄し、洗浄したカートリッジに誘導体化試液（FMOC-Cl アセトニトリル溶液と四ホウ酸ナトリウム 10 水和物水溶液の混合液、1:1（v/v））を通液し、室温下、固相上で誘導体化反応を進行させた（FMOC-GLYP の生成）。
- (5) 固相誘導体化の条件は、先行研究で最適化した条件（FMOC-Cl 濃度：10 mg/mL、四ホウ酸ナトリウム濃度：1 mM、反応時間：30 分）を使用した。
- (6) 固相上で生成した FMOC-GLYP は、SPE カートリッジを超純水 - アセトニトリル混合液（1:1, v/v）およびメタノールで順次洗浄した後、メタノール - トリフルオロ酢酸混合液（100:1）で溶出した。溶出液を窒素気流下で濃縮したものについて、分離カラムとして C18 を、移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 - メタノールを用いた一般的な条件での液体クロマトグラフィー質量分析を行った。質量分析は、リニアトラップ型質量分析計を用い、イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法（極性：ポジティブ）、測定モードはプロダクトイオンスキャンモード（プリカーサーイオン： m/z 392（FMOC-GLYP）・ m/z 395（FMOC-GLYP-2-¹³C、¹⁵N））とした。測定した結果、トータルイオンクロマトグラム（図 1）上で FMOC-GLYP および FMOC-GLYP-2-¹³C、¹⁵N に重なる妨害ピークは認められなかった。
- (7) FMOC-GLYP および FMOC-GLYP-2-¹³C、¹⁵N のプロダクトイオンスペクトル（図 2 および 3）は複数のプロダクトイオンが検出される非常に特異性の高いものであった。
- (8) 検量線は 0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性（ $R^2 > 0.999$ ）を示した。また GLYP 濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ の血液を繰り返し測定したところ、真度は 103 %、日内変動は 1.0 %と、非常に高精度であることが示された。
- (9) GLYP と同じ含リンアミノ酸系除草剤に分類され、中毒事案が発生しているグリホシネート（GLUF）について、内部標準物質として安定同位体置換 GLUF（GLUF-d3）を用い、GLYP と同様の条件で固相誘導体化および液体クロマトグラフィー質量分析（プリカーサーイオン： m/z 404（FMOC-GLUF）・ m/z 407（FMOC-GULF-d3））を行ったところ、0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で高精度な定量（ $R^2 > 0.998$ 、真度 106 %、日内変動 1.5 %）が可能であり、本法は GLUF 中毒事案にも適用可能であることが示された。

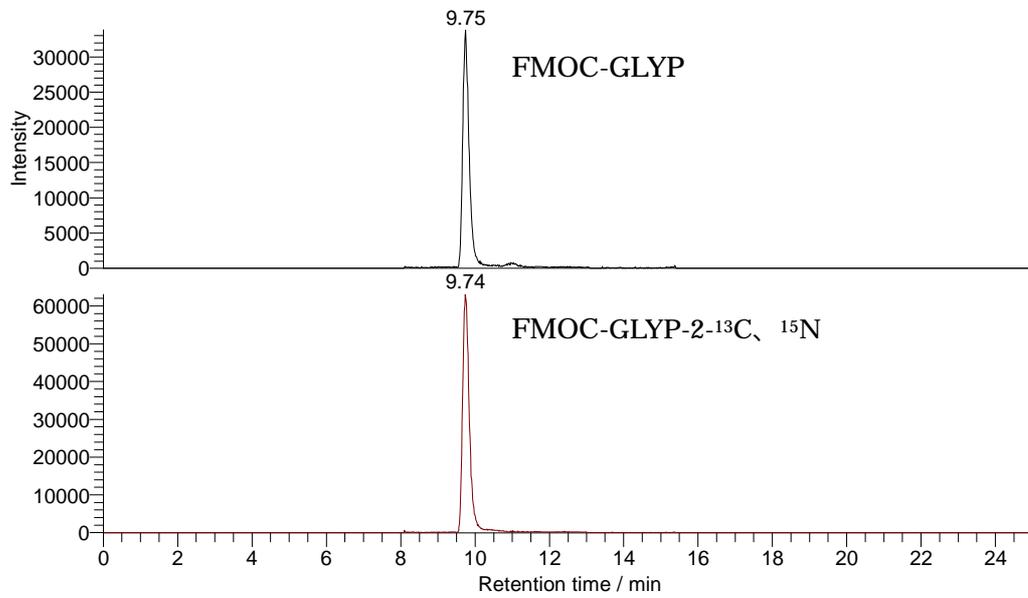


図1 GLYP および GLYP-2-¹³C、¹⁵N 添加血液から得られたトータルイオンクロマトグラム

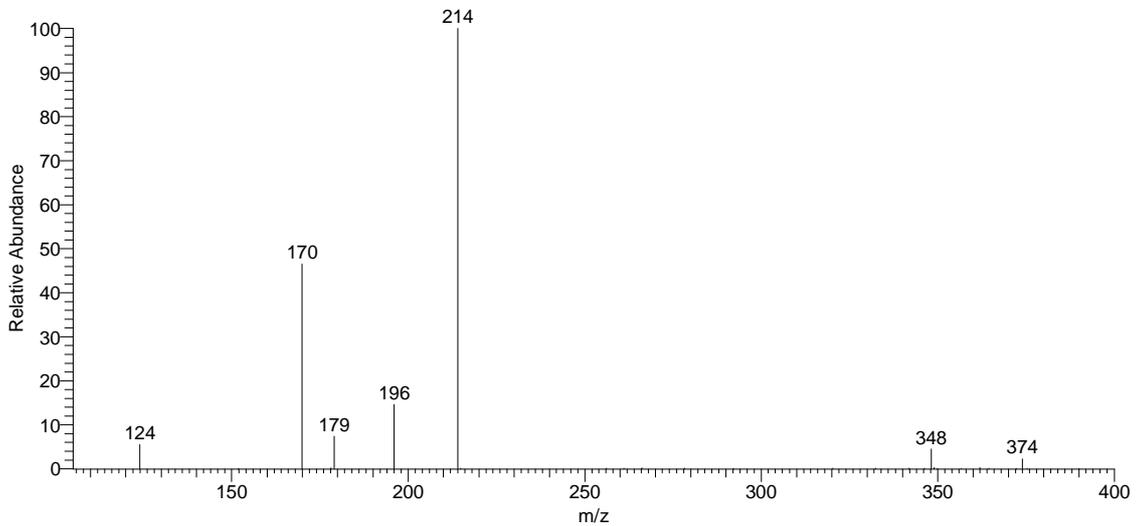


図2 Fmoc-GLYP のプロダクトイオンスペクトル

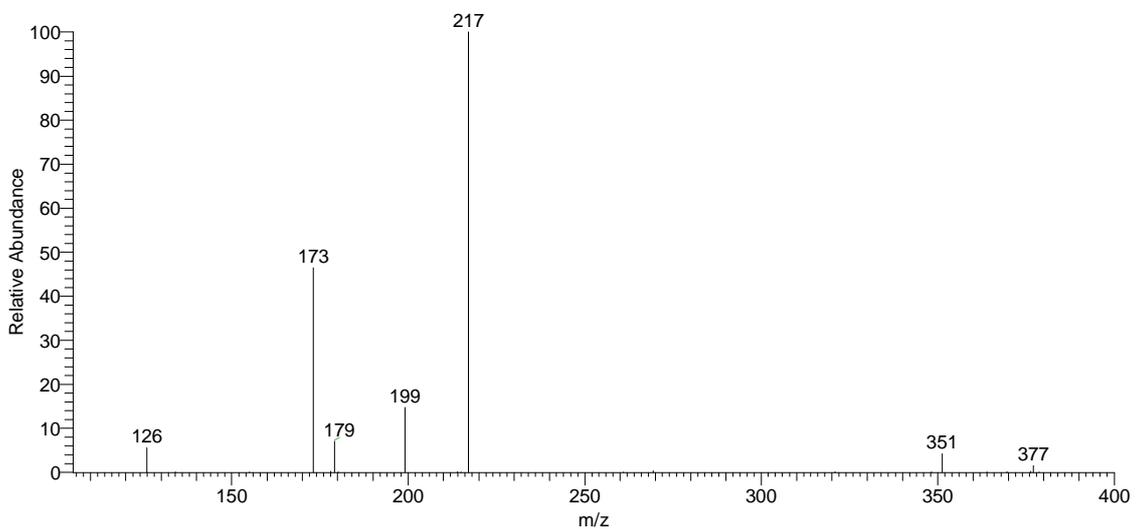


図3 Fmoc-GLYP-2-¹³C、¹⁵N のプロダクトイオンスペクトル

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------